

PROFILUL CTOKINELOR ÎN PLASMA PACIENȚILOR CU MELANOM MALIGN

Natalia Cireap¹, R. Ilina¹, Diana Narita², A. Anghel², Elena Lazar³, T. Nicola¹

1. Departmentul de Chirurgie Oncologică

2. Catedra de Biochimie

3. Catedra de Morfopatologie

Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș”, Timișoara, România

PROFILUL CITOKINELOR ÎN PLASMA PACIENȚILOR CU MELANOM MALIGN (ABSTRACT):

Malignant melanoma is considered to be a prototype of an immunogenic tumor that express a variety of cytokines and growth factors that may stimulate tumor angiogenesis, growth and invasion. The purpose of this study was to analyze and compare the expression levels of a selected panel of twelve inflammatory cytokines/chemokines in the plasma of melanoma patients before any treatment with the expression levels of matched age and sex healthy controls. This study was performed in order to select the most appropriate profile of cytokines that could serve as markers for early diagnosis, prognostic and treatment. The study was performed on patients diagnosed with malignant melanoma that underwent surgery in 2010 compared with healthy controls, using a multi-analyte ELISArray kit. Our results showed a statistically significant increase in plasma levels of six inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-10, IL-17 α , IFN- γ , TNF- α and GM-CSF) (P between $<10^{-4}$ and 0.01). For IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 and IL-12, the plasma levels were also increased but the differences compared with healthy controls were not statistically significant. In conclusion, a complex network of cytokines seems to be triggered in the presence of invasive primary melanoma or metastatic melanoma and this cytokine response is involved in the regulation of melanoma cell growth and progression. Differences in cytokine profiles between melanoma patients and healthy subjects allowed for robust discrimination between these two groups, emphasize the advantage of multimarker analysis for discovery of new predictive serum biomarkers for melanoma and provide additional insights into the pathobiology of melanoma.

KEYWORDS: MALIGNANT MELANOMA, CYTOKINES, MULTIPLEXED ANALYSES, BIOMARKERS

Correspondență: Natalia Cireap, Dr., Chirurgie Oncologică, Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș”, Timișoara, Romania, e-mail: nata_cireap@yahoo.com*

INTRODUCERE

Melanoamele reprezintă un grup heterogen de tumori care apar pe piele, ochi, meninge și alte părți ale corpului. În timp ce stadiile incipiente ale melanoamelor sunt recunoscute prin schimbări în dimensiune, formă sau culoare a nevilor, majoritatea celulelor melanice cresc în adâncime și invadează tesuturile vecine înainte de a fi detectate ca fiind tumori metastazate în nodulii limfatici sau alte organe. Pacienții cu melanom nu răspund bine la terapiile actuale și majoritatea tratamentelor sunt ineficiente[1-6].

* received date: 10.09.2010

accepted date: 01.02.2010

Melanomul este al doilea cancer ca incidență pentru intervalul de vârstă 15 - 29 de ani. Incidența melanomului crește mai repede decât oricare alt cancer, cu o rată de 4% pe an. În 2010, aproximativ 38.870 de bărbați și 29.260 de femei au fost diagnosticați cu melanom invaziv. În plus, se presupune că un număr de aproximativ 8.700 de oameni (5.670 bărbați și 3.030 de femei) vor deceda de melanom în 2010. Diagnosticul timpuriu și excizia chirurgicală pot preveni cu succes evoluția melanomului. Totuși, ratele de răspuns la tratamentul chimioterapic sau imunologic în cazul pacienților cu metastaze avansate rămâne scăzut [7]. Este necesară o analiză mai avansată a comportamentului celulelor melanice pentru obținerea unui tratament mai eficient.

Melanoamele sunt capabile de a produce un spectru larg de citokine și factori de creștere cu multiple funcții biologice. A fost demonstrat că celulele melanice de cultură precum și celulele melanice derivate din melanom primar și metastaze au produs: factorul bazic de creștere al fibroblastelor (bFGF), interleukinele IL-1 α , IL-1 β , IL-6, 8 factorul de creștere al celulelor endoteliale (VEGF) precum și factorul de creștere derivat din plachete (PDGF). Acești factori de creștere acționează ca și factori autocrini și/sau paracrini și sunt capabili să stimuleze creșterea tumorală, invazia și angiogeneza sau se manifestă ca molecule de adeziune sau proteine anti-apoptotice. În acest context, studiul acestor factori ar putea îmbunătăți înțelegerea biologiei melanomului și ar putea facilita abordarea terapeutică [8-11].

Creșterea concentrațiilor unui număr variat de citokine, factori angiogenici și factorii de creștere ar putea servi ca biomarkeri pentru diagnosticul timpuriu al melanomului, pentru prognostic și de asemenea, ar putea permite monitorizarea bolii și a răspunsului la terapie. Unele studii au evaluat deja o serie de proteine plasmatică în ceea ce privește relevanța asupra prognosticului și diagnosticului melanomului. Mai precis, nivele ridicate de IL-6 au fost asociate cu prognosticul rezervat în cazul pacienților cu melanom în stadiul IV, iar valorile ridicate de IL-10 au fost asociate cu stadiile avansate ale melanomului (stadiul III și IV) [12-17].

Scopul acestui studiu a fost de a analiza expresia unui panel de 12 citokine sau chemokine inflamatorii (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 α , IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) în plasma pacienților cu melanom, înainte de orice tratament, comparativ cu expresia aceluiași citokine în plasma pacienților de control, sănătoși, folosind un kit ELISA multianalit, multiplexat. Acest studiu a fost conceput pentru a selecta un set de citokine care ar putea servi ca markeri pentru diagnosticul timpuriu, prognosticul și monitorizarea evoluției și tratamentului în cazul melanomului malign.

METODĂ

Pacienți și caracteristici tumorale Au fost incluși în studiu 17 pacienți care au suferit intervenții chirurgicale în Clinica II de Chirurgie Generală și Oncologică, Timișoara în cursul anului 2010 precum și 20 voluntari sănătoși, potriviți ca și vârstă și sex. Consimțământul a fost obținut de la toți și voluntarii sănătoși, iar studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică al Universității noastre. Tabelul 1 rezumă caracteristicile pacienților care au fost incluși în studiu.

Prepararea eșantioanelor Plasma a fost recoltată de la pacienți înainte de a primi orice tratament precum și de la 20 de voluntari sănătoși, utilizând EDTA ca și anticoagulant.

În termen de 30 de minute de la colectare, sângele venos periferic recoltat după metodele obișnuite, standardizate, s-a centrifugat timp de 5 minute la 3000 \times g.

Plasma obținută a fost imediat separată și păstrată în congelator la -80°C până la efectuarea analizelor. A fost evitată înghețarea / dezghețarea repetată.

Tabel 1
Pacienți și caracteristici tumorale

Vârstă	Gen	Localizare	Histologie	TNM	Stadiu	Clark	Breslow (mm)	Ulcerație
51	F	Trunchi	Nodular	T3bN0M0	IIB	III	4	Prezent
24	F	Membru Sup	Cu creștere în suprafață	T1aN0M0	IA	III	0.9	Absent
43	F	Coapsă	Nodular	T4bN2aM0	IIIB	V	>3.5	Prezent
57	F	Picior	Cu creștere în suprafață	T1aN0M0	IA	III	1	Absent
46	M	Abdomen	Cu creștere în suprafață	T2aN0M0	IB	III	1.5	Prezent
59	F	Cap	Nodular	T2bN0M0	IIA	V	1.5	Prezent
53	F	Coapsă	Nodular	T2aN0M0	IB	III	1.5	Absent
51	F	Membru Sup	Cu creștere în suprafață	T1aN0M0	IA	III	1	Absent
54	F	Haluca	Lentiginos acral	T3aN0M0	IIA	IV	2.3	Prezent
30	M	Cap	Nodular	T4bN0M0	IIC	V	>3	Prezent
54	F	Picior	Nodular	T3aN2M0	IIIA	III	3.5	Absent
52	M	Cap	Nodular	T3bN0M0	IIB	IV	>3	Prezent
36	M	Trunchi	Lentigo malign	T3bN0M0	IIB	IV	≥2.5	Prezent
69	F	Cap	Nodular	T3bN0M0	IIB	IV	<3	Prezent
54	M	Trunchi	Nodular	T4aN2bM0	IIIB	V	>4	Prezent
60	F	Trunchi	Cu creștere în suprafață	T4bN0M0	IIC	V	>4	Prezent
59	M	Trunchi	Nodular	T4bN3M0	IIC	V	6	Prezent

Analiza citokinelor plasmastice Au fost analizate 12 citokine diferite utilizând kit-ul Multi-Analyte ELISArray (SABiosciences, Qiagen, Germany). Kit-urile Multi-Analyte ELISArray sunt concepute pentru a analiza citokine și/sau chemokine multiple, simultan, folosind tehnica ELISA (sandwich-based enzyme-linked immunosorbent assay). La microplaca ELISA cu 96 godeuri a fost atașat un panel de douăsprezece anticorpi țintă specifici, câte unul într-un șir de 8 godeuri, permițând astfel analiza calitativă a șase probe simultan, alături de probele control pozitive și negative.

Pe scurt, etapele de lucru au fost următoarele: s-au pregătit toți reactivii conform protocolului recomandat de firma producătoare (SABiosciences-Qiagen); s-au efectuat diluțiile probelor biologice și a controalelor pozitive și negative; s-au adăugat 50 μl soluție tampon în fiecare godeu al plăcii ELISArray; s-au transferat 50 μl de probe, respectiv probe control în godeurile corespunzătoare; s-au incubat 2 ore; spălare de trei ori; s-au adăugat 100 μl soluție de detecție; incubare o oră; spălare de trei ori; s-au adăugat 100 μl complex avidin – peroxidază, după care s-au incubat 30 de minute; spălare de patru ori; s-au adăugat 100 μl soluție de dezvoltare a reacției; incubare 15 minute la întuneric apoi s-au adăugat 100 μl soluție stop.

S-a citit absorbanta la 450 nm în maximum 30 minute, la cititorul de microplăci ELISA STAT FAX 2100 (Awareness Technology Inc, USA). *Analiza statistică* Analiza datelor a fost efectuată cu ajutorul testului Wilcoxon (Mann-Whitney). Pragul pentru care datele sunt semnificative a fost stabilit la $p < 0.05$.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza markerilor plasmatici Pentru a analiza diferențele concentrațiilor plasmatiche ale citokinelor la pacienții cu melanom în comparație cu martorii sănătoși, au fost prelevate probe de plasmă de la 17 pacienți înainte de orice tratament și de la 20 voluntari sănătoși, potriviți ca și vârstă și sex cu pacienții. Au fost dozate 12 citokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 α , IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) prin metoda ELISA. Nivelurile plasmatiche a șase citokine inflamatorii (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 și IL-12) au fost crescute la pacienții cu melanom, dar fără să prezinte diferențe semnificative statistic comparativ cu martorii sănătoși. O creștere statistic semnificativă (P între $<10^{-4}$ și 0.01) a fost observată în plasma pacienților cu melanom comparativ cu martorii sănătoși pentru următoarele citokine: IL-1 β , IL-10, IL-17 α , IFN- γ , TNF- α și GM-CSF. Aceste rezultate (Tabel 2, Fig. 1) indică faptul că pacienții cu melanom au prezentat un model semnificativ diferit al expresiei citokinelor comparativ cu subiecții sănătoși.

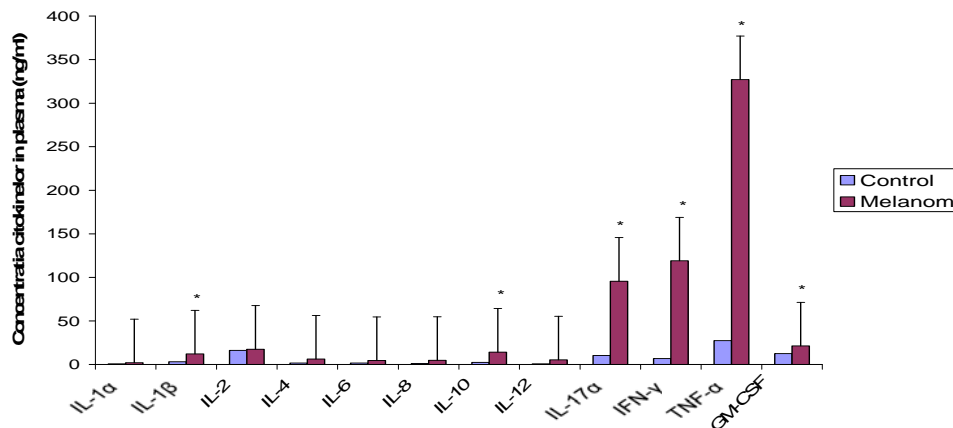


Fig. 1. Modelul de expresie al citokinelor în melanom comparativ cu grupul control - *diferențe semnificativ statistice (P între 0.01 și $<10^{-4}$)

Tabel 2

Expresia citokinelor la pacienții cu melanom comparativ cu grupul control

Citokine	Control	Melanom	P
IL-1 α	0.79	1.98	0.51
IL-1 β	3.29	12.25	0.01
IL-2	16.15	17.55	0.26
IL-4	1.71	6.29	0.10
IL-6	1.71	4.71	0.31
IL-8	1.21	4.82	0.19
IL-10	2.45	14.31	0.0001
IL-12	0.76	5.34	0.08
IL-17 α	10.34	95.61	<0.001
IFN- γ	6.90	118.96	<0.001
TNF- α	27.37	327.09	<0.001
GM-CSF	12.52	21.34	0.0002

Melanomul este considerat a fi un prototip de tumoră imunogenică. Celulele melanice exprimă o mare varietate de citokine și factori de creștere care pot stimula angiogeneza, creșterea și invazia tumorală [18-19]. Unele citokine sau factori de creștere pot funcționa ca factori autocrini în scopul stimulării creșterii tumorale, în timp ce factorii paracrini stimulează invazivitatea tumorii. Mai mult decât atât, unele dintre ele pot trece de la o funcție autocrină la o funcție paracrină. Citokinele și factorii de creștere au un impact asupra mai multor procese biologice critice, cum ar fi reglarea expresiei genice și proliferarea celulară pentru promovarea inflamației cronice. Acești factori pot fi implicați în activarea mecanismelor efectoare care limitează creșterea tumorală, acționând în beneficiul pacienților, sau din contră, ele pot contribui la inflamarea, transformarea, creșterea și invazia tumorală.

Stimularea creșterii tumorale este efectul multiplelor rețele de factori de creștere, iar aceste interacțiuni sunt mult mai complicate in vivo, interacțiuni care trebuie să fie luate în considerare atunci când concepem strategiile terapeutice [11,13,17].

Vom rezuma cele mai importante relații cunoscute între citokinele investigate și procesul de creștere și progresie al melanomului:

IL-1 α este o citokină pro-inflamatorie, care inițiază un răspuns imun împotriva celulelor apoptotice [18]. IL-1 α este produsă de celulele epiteliale. S-a presupus că IL-1 α este o citokina epidermală [19]. Deși există numeroase interacțiuni ale IL-1 α cu alte citokine, cea mai consistentă și mai relevantă clinic este sinergismul ei cu TNF, în timp ce IL-10 inhibă sinteza IL-1 α . Interleukina-1 (IL-1) cu subtipurile α și β s-a dovedit a avea efecte anti-proliferative pe linia de melanom A375 [20-24].

IL-1 β este un membru al familiei de citokine proinflamatorii, care modulează reacția de fază acută. Anihilarea cu siRNA a IL-1 β la nivelul fibroblastelor a determinat inhibarea invaziei melanomului, fiind astfel demonstrat in vitro rolul IL-1 β secretat de fibroblaste în invazia melanomului. De asemenea, tratarea unor celule melanice cu IL-1 β a redus cu 40-100% capacitatea lor de a activa limfocitele citolitice T anti-melanomice [23].

În prezent, dozele mari de **IL-2** reprezintă singurul tratament aprobat, cu un efect durabil asupra recidivei și mortalității melanomului în stadiu avansat. Singura terapie adjuvantă aprobată de FDA (Food and Drug Administration) pentru stadiu avansat operabil (stadiul IIB) și melanom nodal regional (stadiul III) este doza mare de IFN- α 2b (HDI). HDI a fost dovedit a avea un efect durabil asupra supraviețuirii fără recădere a melanomului, cu o reducere de 27% până la 33% a pericolului de recidiva la pacienții cu risc crescut de recidiva [24]. Acest agent induce răspunsuri clinice obiective la 16% dintre pacienți cu melanom avansat inoperabil. Rămâne neclar de ce unii pacienți răspund, iar unii nu răspund deloc la terapia cu IFN- α 2b, iar bazele moleculare ale efectelor antitumorale ale IFN- α 2b administrate ca adjuvant au sugerat că efectul acestuia variază de la efecte directe citotoxice, la modulare imunologică și antiangiogenică la nivelul gazdei [25-28].

IL-4R sunt exprimate pe o mare varietate de tumori umane solide, iar **IL-4** singur și în asociere cu IFN γ pot juca un rol în răspunsul imun al gazdei împotriva cancerului [23].

Interleukina-6 (IL-6) poate afecta diferențiat proprietățile de creștere ale celulelor melanice. Proliferarea melanocitelor umane și creșterea numărului melanoamelor în stadiu incipient sunt inhibate de IL-6 eliberată de fibroblaste [24,25]. Sinteza de IL-6 în celulele melanice B16 determină întârzierea creșterii [24] prin

oprirea ciclului celular la nivelul G1/G0. Melanoamele în stadiul avansat sunt rezistente la efectul anti-proliferativ al IL-6; mai mult de 50% dintre ele exprima constitutiv IL-6 ARNm și, de asemenea, secretă IL-6 în mediul de cultură, fiind prin urmare în măsură să prezinte o creștere autonomă. A rezultat o inhibare semnificativă a creșterii atunci când au fost adăugate oligonucleotidele antisens IL-6 la cultura de celule, dar anticorpii de neutralizare au fost ineficienți. Acest lucru demonstrează că IL-6 este o “citokină bifuncțională” și IL-6 endogenă se poate comporta ca un stimulator intracelular de creștere autocrin, care acționează asupra receptorilor specifici [29].

Interleukina-8 (IL-8) este o chemokină produsă de macrofage și de alte tipuri de celule, cum ar fi celulele epiteliale. De asemenea, este sintetizată de celulele endoteliale care stochează IL-8 în veziculele lor de stocare și a fost demonstrat că IL-8 endotelială inhibă infiltrarea tumorii cu limfocite, rezultând un răspuns imun scăzut. Există mai mulți receptori membranari capabili să lege IL-8. Cele mai frecvente tipuri studiate sunt proteinele G care cuplează receptorii serpentinici CXCR1 și CXCR2 secretați de celulele melanice. [30-33].

Interleukina-10 Multe studii au sugerat ca nivelurile crescute de IL-10 sunt promotori tumorali în melanom. In vivo, un număr considerabil de pacienți cu melanom avansat au prezentat nivele serice crescute de IL-10, iar celulele umane melanice produc IL-10 in vivo. Alte studii au sugerat ca IL-10 este un factor de creștere autocrin pentru celulele melanice umane și IL-10 poate fi exprimat preferențial în leziuni metastatice. Aceste constatări privind rolul IL-10 în scăparea tumorii de sub răspunsul imun se explică pe baza proprietăților sale imunosupresoare, prin suprimarea producției de citokine de tip Th1, și în special IL-2. Cu toate acestea, alte studii au demonstrat că IL-10 exercită activități antitumorale și anti-metastatice prin inhibarea angiogenezei in vivo, deoarece tumorile maligne nu pot crește mai mult de 2-3 mm³ și nu pot metastaza fără stimularea formării de noi vase de sânge. Mecanismul pentru acest fenomen poate fi reprezentat prin capacitatea IL-10 de a reduce sinteza factorului de creștere endotelial vascular (VEGF) - unul dintre cei mai puternici factori angiogenici - împreună cu IL-1β, factorul de necroză tumorală, IL-6 și metaloproteinaza - 9 (MMP-9) în macrofagele asociate tumorii, care joacă de asemenea un rol crucial în angiogeneză. Alte studii au demonstrat că IL-10 inhibă metastazele tumorale prin intermediul unui mecanism dependent de celulele natural killer. [23, 34-35].

IL-12. Celulele monocitare par a fi principala sursă de IL-12, dar și alte celule cum ar fi celulele mastocitare, celulele B, keratinocitele și celulele dendritice pot produce IL-12. Receptorii pentru IL-12 au fost descriși la nivelul celulelor NK și T, celule care răspund prin îmbunătățirea proliferării și creșterea activității citolitice. În plus, citokinele cum ar fi IFN-γ sunt eliberate de celulele T după stimularea cu IL-12. Niveluri ridicate de interleukina-12 reprezintă un marker de prognostic scăzut, în special pentru pacienții cu melanom cu vârstă mai înaintată.

Un studiu efectuat pe 150 de pacienți cu melanom în stadiul III a constatat că niveluri crescute de IL-12 sunt asociate cu un risc de deces de 5 ori mai mare. Mai mult, introducerea genei IL-12 în celulele tumorale sau în fibroblastele mixate ulterior cu celule tumorale autologe a determinat un puternic efect inhibitor al creșterii, precum și efecte antimetastatice. Transferul genei IL-12 a indus un răspuns TH1 și a generat o imunitate antitumorală puternică [36-39].

Cel mai notabil rol al **IL-17** este implicarea în inducerea și medierea răspunsurilor proinflamatorii.

IL-17 induce producerea multor altor citokine (cum ar fi IL-6, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α), chemokine (inclusiv IL-8, GRO- α , și MCP-1) și prostaglandine din multe alte tipuri de celule (fibroblaști, celule endoteliale, celule epiteliale, keratinocite și macrofage). Funcția IL-17 este de asemenea esențială pentru un subset de celule T CD4+ și anume celule T helper 17 (Th17). Ca urmare a acestor funcții, familia IL-17 a fost asociată cu multe boli imune/autoimune conexe și cu imunitatea anti-tumorală [40-41].

TNF- α este considerat un factor răspunzător de cașexia neoplazică, fiind produs de macrofage, monocite, fibroblaste, keratinocite precum și alte celule. Este implicat în inflamația sistemică, stimulând reacția de fază acută. TNF- α este liantul receptorului factorului de creștere epidermică. Aceasta poate funcționa printr-un mecanism autocrin sau paracrin și contribuie la supraviețuirea tumorii prin stimularea expresiei genelor anti-apoptotice. Pe de altă parte, este un mediator pro-apoptotic atunci când este combinat cu interferon. TNF- α este utilizat clinic în asociere cu melfalan în perfuzia regională hipertermică în tratamentul melanomului membrelor [42-44].

GM-CSF are efecte anti-tumorale, prin generarea de celule prezentatoare de antigen (APC) eficiente în prelucrarea celulele apoptotice și inducerea imunității celulare și umorale. GM-CSF prezintă un interes special deoarece se administrează clinic ca tratament adjuvant pentru inducerea APC în vaccinurile împotriva melanomului. Celulele dendritice și macrofagele sunt eficiente în captarea celulelor tumorale moarte, în inducția celulară și imunitatea umorală. Pe de altă parte, s-a remarcat că doze mari de GM-CSF administrat în vaccinuri poate avea un efect imunosupresor. Prin urmare, prezența sa în țesutul melanomului poate indica imunopresia locală a celulelor tumorale sau ar putea să inducă celulele dendritice și macrofagele să curețe resturile de celule tumorale moarte [45-46].

CONCLUZII

Rezultatele noastre au arătat că nivelurile plasmatice a șase citokine inflamatorii, și anume - IL-1 β , IL-10, IL-17 α , IFN- γ , TNF- α și GM-CSF - au fost semnificativ crescute la pacienții cu melanom, în timp ce alte citokine (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 și IL-12), deși au fost crescute la pacienți, diferențele nu au prezentat valori semnificative față de lotul de control.

În concluzie, o rețea complexă de citokine pare a fi declanșată în cazul invaziei melanomului primar, acest răspuns citokinic fiind implicat în reglarea creșterii și evoluției celulelor melanice. Diferențele în ceea ce privește profilul citokinelor între pacienții cu melanom și subiecții sănătoși au permis o discriminare robustă între aceste două grupuri. De asemenea, prin acest studiu am evidențiat avantajul analizei multiplexate pentru descoperirea de noi biomarkeri plasmatice și am creat premisele unei mai bune înțelegeri a patobiologiei melanomului.

Mulțumiri: Această lucrare a fost susținută prin CNCSIS – UEFISCSU, număr proiect 1197/2009, PN II – IDEI, PCE, cod 1750/2008.

BIBLIOGRAFIE

1. Pihorecky I, Lee RJ, Proulx G, Kollmorgen DR, Jia C, Driscoll DL, Kraybill WG, Gibbs JF. Risk factors for nodal recurrence after lymphadenectomy for melanoma. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(2): 109-115.
2. Kim SH, Garcia C, Rodriguez J, Coit DG. Prognosis of thick cutaneous, melanoma. *J Am Coll Surg* 1999; 188(3): 241- 247.

3. Clary BM, Brady MS, Lewis JJ, Coit DG. Sentinel lymph node biopsy in the management of patients with primary cutaneous melanoma: review of a large single-institutional experience with an emphasis on recurrence. *Ann Surg* 2001; 233(2): 250-258.
4. Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 1995; 181(3): 193-201.
5. Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol* 2000; 18(22): 3782-3793.
6. Balch CM, Soong SJ, Smith T, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, Temple WJ, Mihm MC, Barnhill RL, Jewell WR, Wanebo HJ, Desmond R; Investigators from the Intergroup Melanoma Surgical Trial. Long-term results of a prospective surgical trial comparing 2 cm vs. 4 cm excision margins for 740 patients with 1-4 mm melanomas. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(2): 101-108.
7. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlander N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/.
8. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, Gorelik E, Lokshin AE. Multiplex Analysis of Serum Cytokines in Melanoma Patients Treated with Interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res* 2007; 13(8): 2422-2422.
9. Ciotti P, Rainero ML, Nicolò G, Spina B, Garrè C, Casabona F, Santi PL, Bianchi-Scarrà G. Cytokine expression in human primary and metastatic melanoma cells: analysis in fresh bioptic specimens. *Melanoma Res* 1995; 5(1): 41-47.
10. Westphal JR, Van't Hullenaar R, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U, Askaa J, Clemmensen I, Ruiten DJ, De Waal RM. Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. *Int J Cancer* 2000; 86(6): 768-776.
11. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000; 12(6): 547-554.
12. Colombo MP, Maccalli C, Mattei S, Melani C, Radrizzani M, Parmiani G. Expression of cytokine genes, including IL-6, in human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1992; 2(3): 181-189.
13. Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* 1994; 56(6): 853-857.
14. Tartour E, Dorval T, Mosseri V, Deneux L, Mathiot C, Brailly H, Montero F, Joyeux I, Pouillart P, Fridman WH. Serum interleukin 6 and C-reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients. *Br J Cancer* 1994; 69(5): 911-913.
15. Soubrane C, Rixe O, Meric JB, Khayat D, Mouawad R. Pretreatment serum interleukin-6 concentration as a prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study. *Melanoma Res* 2005; 15(3): 199-204.
16. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Bröcker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5(1): 67-68.
17. Vihinen P.P., Pyrhonen S.O., Kahari V.M. New prognostic factors and developing therapy of cutaneous melanoma. *Ann Med* 2003; 35(2): 66-78.
18. Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med* 1994; 180(1): 1-7.
19. Elias EG, Hasskamp JH, Sharma BK. Cytokines and Growth Factors Expressed by Human Cutaneous Melanoma. *Cancers* 2010, 2(2): 794-808.
20. Cruse JM, Lewis RE, Wang H. Cytokines and chemokines. In Cruse JM, Lewis RE, Wang H. eds. *Immunology Guidebook*. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science & Technology Books. 2004; p. 339-392.
21. Rodeck U. Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Metastasis Rev.* 1993, 12(3-4): 219-226.
22. Krasagakis K, Garbe C, Orfanos CE. Cytokines in human melanoma cells: synthesis, autocrine stimulation and regulatory functions-an overview. *Melanoma Res.* 1993, 3(6): 425-433.

23. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; 445(7130): 851–867.
24. Tyler DS, Francis GM, Frederick M, Tran AH, Ordóñez NG, Smith JL, Eton O, Ross M, Grimm EA. Interleukin-1 production in tumor cells of human melanoma surgical specimens. *J. Interferon Cytokine Res.* 1995, 15(4): 331–340.
25. Moschos SJ, Edington HD, Land SR, Rao UN, Jukic D, Shipe-Spotloe J, Kirkwood JM. Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon a-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses. *J Clin Oncol* 2006; 24(19): 3164 -3171.
26. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH. High and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/ C9190. *J Clin Oncol* 2000; 18(12):2444-2458.
27. Kirkwood JM, Richards T, Zarour HM, Sosman J, Ernstoff M, Whiteside TL, Ibrahim J, Blum R, Wieand S, Mascari R. Immunomodulatory effects of high-dose and low-dose interferon alpha-2b in patients with high- risk resected melanoma: the E2690 laboratory corollary of intergroup adjuvant trial E1690. *Cancer* 2002; 95(5):1101-1012.
28. Kirkwood JM, Manola J, Ibrahim J, Sondak V, Ernstoff MS, Rao U; Eastern Cooperative Oncology Group. A pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group and intergroup trials of adjuvant high-dose interferon for melanoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(5): 1670-1677.
29. Akira, S., Taga T., Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 1993, 54: 1–78.
30. Leong SR, Lowman HB, Liu J, Shire S, Deforge LE, Gillece-Castro BL, McDowell R, Hébert CA. IL-8 single chain homodimers and heterodimers: interactions with chemokine receptors CXCR-1, CXCR-2 and DARC. *Protein Sci.* 1997, 6(3): 609–617.
31. Gabellini C, Trisciuglio D, Desideri M, Candiloro A, Ragazzoni Y, Orlandi A, Zupi G, Del Bufalo D. Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. *Eur. J. Cancer* 2009, 45: 2618–2627.
32. Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006, 125(2): 209–216.
33. Singh S, Sadanandam A, Nannuru KC, Varney ML, Mayer-Ezell R, Bond R, Singh RK. Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by decreasing tumor cell proliferation, survival and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15(7): 2380–2386.
34. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 929-979.
35. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Bröcker EB. Elevated serum level of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1995, 5(1): 67–68.
36. Tan J, Newton CA, Djeu JY, Gutsch DE, Chang AE, Yang NS, Klein TW, Hua Y. Injection of complementary DNA encoding interleukin-12 inhibits tumor establishment at a distant site in a murine renal carcinoma model. *Cancer Res* 1996; 56(15): 3399–3403.
37. Tahara H, Zeh HJ 3rd, Storkus WJ, Pappo I, Watkins SC, Gubler U, Wolf SF, Robbins PD, Lotze MT. Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res* 1994; 54(1): 182–189.
38. Windhagen A, Anderson DE, Carrizosa A, Williams RE, Hafler DA. IL-12 induces human T cells secreting IL-10 and IFN- γ . *J Immunol* 1996; 157(3): 1127–1131.
39. Sun Y, Jurgovsky K, Möller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, Schadendorf D. Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Therapy* 1998; 5(4): 481–490
40. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J. Immunol.* 2009, 183(7): 4169–4175.
41. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J. Clin. Invest.* 2001, 107(3): 241–246.
42. Hayes AJ, Neuhaus SJ, Clark MA, Thomas JM. Isolated limb perfusion with melphalan and tumor necrosis factor α for advanced melanoma and soft-tissue sarcoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2007, 14(1): 230–238.

43. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. IFN-alpha suppresses activation of nuclear transcription factors NF-Kappa and activation protein 1 and potentiates TNF-induced apoptosis. *J. Immunol.* 2000, 165(9): 4927–4934.
44. Rossi CR, Russano F, Mocellin S, Chiarion-Sileni V, Foletto M, Pilati P, Campana LG, Zanon A, Picchi GF, Lise M, Nitti D. TNF-based isolated limb perfusion followed by consolidation biotherapy with systemic low-dose interferon alpha 2b in patients with in-transit melanoma metastases: a pilot trial. *Ann. Surg. Oncol.* 2008, 15(4): 1218–1223.
45. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 2004, 64(17): 6337–6343.
46. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G, Rivoltini L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in the peripheral blood of melanoma patients with modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based antitumor vaccine. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25(18): 2546–2553.